



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 15 525 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 15 525.1  
㉔ Anmeldetag: 30. 3. 2000  
㉓ Offenlegungstag: 11. 10. 2001

㉕ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 C 65/19**

C 07 C 65/24  
C 07 C 65/105  
C 07 C 69/84  
A 61 K 31/60  
A 61 K 31/625

**DE 100 15 525 A 1**

㉑ Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

㉒ Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea  
Schüßler, 81825 München

㉑ Erfinder:  
Gerhäuser, Clarissa, Dr., 69121 Heidelberg, DE;  
Eicher, Theophil, Prof. Dr., 66123 Saarbrücken, DE;  
Pick, Rigobert, 66606 St Wendel, DE

㉕ Entgegenhaltungen:  
DD 1 26 866 A  
EP 05 64 920 A1  
Synthesis 1991, 98-102;  
Synthesis 1988, 525-529;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉕ Synthetische Derivate von Lunularsäure, Arzneimittel enthaltend diese Verbindung, Verfahren zur Herstellung  
der Lunularsäurederivate sowie deren Verwendung

㉕ Die Erfindung betrifft Lunularsäurederivate, die sich als  
chemopräventive Agentien eignen.

**DE 100 15 525 A 1**

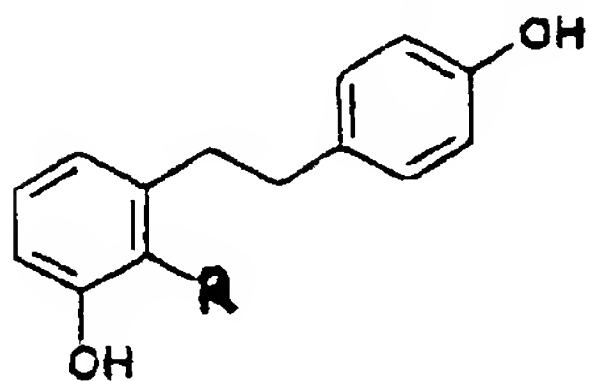
[0001] Die Erfindung betrifft synthetische Derivate von Lunularsäure, Arzneimittel enthaltend diese Verbindungen, Verfahren zur Herstellung der Lunularsäurederivate sowie deren Verwendung als chemopräventive Agentien gegen

Krebserkrankungen.  
[0002] Da Krebs eine Erkrankung ist, die heute aus verschiedensten Gründen (z. B. Älterwerden der Bevölkerung, negative Umwelteinflüsse usw.) schon ein Drittel der Bevölkerung von Industriestaaten betrifft und noch mit einer weiteren Zunahme der Erkrankungen zu rechnen ist, gibt es Bemühungen Stoffe herauszufinden, welche frühzeitig angewendet, einen Schutz vor dem Entstehen von Krebs geben (Krebsprophylaxe). Es gibt deshalb eine ausgedehnte Forschungsrichtung, die sich mit der Identifikation neuer chemopräventiver Agentien beschäftigt, um den dringenden Bedarf der Krebsverhütung zu decken.

[0003] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Identifikation neuer chemopräventiver Agentien, die einfach und nebenwirkungsfrei anzuwenden sind.

[0004] Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

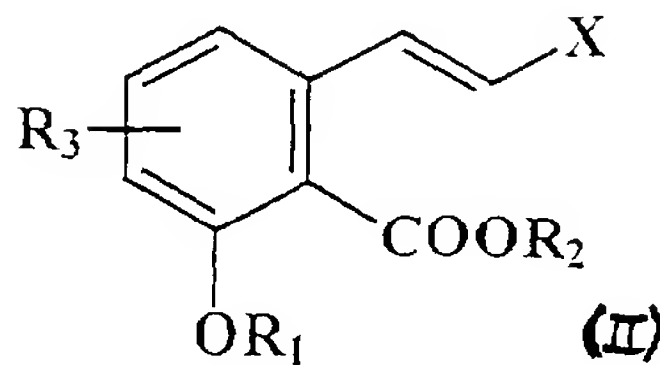
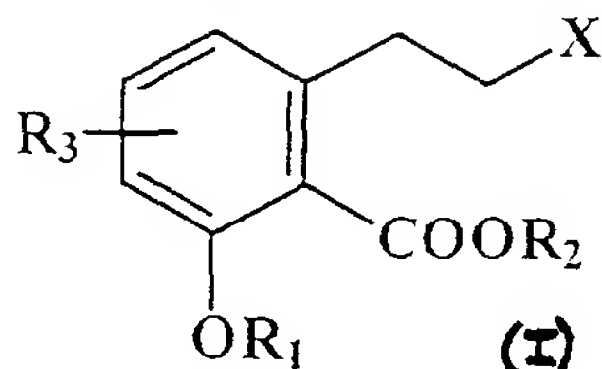
[0005] Von den Erfindern wurde bereits früher gefunden, daß Lunularsäure (2-Hydroxy-6-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]benzoesäure) und Lunularin, die aus Leberblümchen, welche zur Kategorie der Moose gehören, isoliert werden können, eine chemopräventive Wirkung haben.



Lunularsäure: R = COOH

Lunularin: R = H

[0006] Jetzt wurde weiter herausgefunden, daß bestimmte Derivate der Lunularsäure eine noch weit über Lunularsäure und Lunularin hinausgehende positive Wirkung haben und selbst in geringen Dosen noch gegen Stoffwechselprozesse schützen, die für eine Krebsentstehung verantwortlich gemacht werden können. Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder (II)



worin X ein beliebiger mono- oder polycyclischer (Hetero)Arylrest, der ggf. substituiert ist, ist. Beispiele hierfür sind ein carbocyclischer, monocyclischer Rest, beispielsweise die Phenylgruppe, ein heterocyclischer, monocyclischer Rest, beispielsweise die Gruppen Thienyl, Thiophenyl, Furyl, Furanyl, Pyranyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Pyridyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazinyl, Pyridazinyl, Thiazolyl, Oxazolyl, Indolyl, Furazanyl, Pyrrolinyl, Imidazolinyl, Pyrazolinyl, Thiazolinyl, Triazolyl, Tetrazolyl, sowie die Positionsisomeren des oder der Heteroatome, die diese Gruppen umfassen können, ein Rest bestehend aus carbocyclischen kondensierten Ringen, beispielsweise die Naphthylgruppe oder die Phenanthrenylgruppe, ein Rest bestehend aus kondensierten heterocyclischen Ringen, beispielsweise Benzofuranyl, Benzothienyl, Benzimidazolyl, Benzothiazolyl, Naphtho[2,3-b]thienyl, Thianthrenyl, Isobenzofuranyl, Chromenyl, Xanthenyl, Phenoxathiinyl, Indolizinyl, Isoindolyl, 3H-Indolyl, Indolyl, Indazolyl, Purinyl, Chinolizinyl, Isochinolyl, Chinolyl, Phthalziny, Naphthyridinyl, Chinoxaliny, Chinazolinyl, Chinolinyl, Pteridinyl, Carbazolyl,  $\beta$ -Carbolinyl, Cinnolinyl, Acridinyl, Phenazinyl, Phenothiazinyl, Phenoxazinyl, Indolinyl, Isoindolinyl, Imidazopyridyl, Imidazopyridimidinyl oder auch die kondensierten polycyclischen Systeme bestehend aus heterocyclischen Monozyklen, wie beispielsweise vorstehend definiert, wie beispielsweise Thionaphthenyl, Furo[2,3-b]pyrrol oder Thieno[2,3-b]furan, und insbesondere die Phenyl-, Furylgruppen, wie 2-Furyl, Imidazolyl, wie 2-Imidazolyl, Pyridyl, wie 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, Pyrimidinyl, wie Pyrimidin-2-yl, Thiazolyl, wie Thiazol-2-yl, Thiazolinyl, wie Thiazolin-2-yl, Triazolyl, wie Triazolyl-2-yl, Tetrazolyl, wie Tetrazol-2-yl, Benzimidazolyl, wie Benzimidazol-2-yl, Benzothiazolyl, Benzothiazol-2-yl, Purinyl, wie Purin-7-yl, oder Chinolyl, wie 4-Chinolyl.

[0007] In den obigen Formeln können  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, einen geraden oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen geraden oder verzweigten Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen, oder einen mono- oder polyzyklischen aromatischen Rest bedeuten, wobei diese Reste gegebenenfalls durch einen oder mehrere Substituenten substituiert sein können.  $R_1$  und  $R_2$  können gleich oder verschieden sein.

[0008] Es kann für  $R_1$  und/oder  $R_2$  jeder beliebige gerade oder verzweigte  $C_{1-30}$ -Alkylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, tert.-Butyl-, n-Butyl-, n-Hexyl-, 2-Methylpentyl-, 2,3-Dimethylbutyl-, n-Heptyl-, 2-Methylhexyl-, 2,2-Dimethylpentyl-, 3,3-Dimethylpentyl-, 3-Ethylpentyl-, n-Octyl-, 2,2-Dimethylhexyl-, 3,3-Dimethylhexyl-, 3-Methyl-3-ethylpentylgruppen. Bevorzugt sind wegen der besseren Löslichkeit kurze Alkylketten, wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Isopropyl-. Bevorzugt sind  $R_1$  und  $R_2$  gerade  $C_{1-14}$ -Alkyl-

reste oder C<sub>3-14</sub>-Cycloalkylreste. Besonders bevorzugt stehen R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> für H, CH<sub>3</sub> oder CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>.

[0009] Es kann für R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> jeder beliebige gerade oder verzweigte C<sub>2-30</sub>-Alkenylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Vinyl-, Propenyl-, Isopropenyl-, Allyl-, 2-Methylallyl-, Butenyl- oder Isobutenyl-, Hexenyl- oder Isohexenyl-, heptenyl- oder Isoheptenyl-, Octenyl- oder Isooctenylgruppen. Bevorzugt sind Vinyl-, Propenyl- und Isopropenyl-.

[0010] So kann R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> jeder beliebige Cycloalkylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl- oder Cyclohexyl-, Cycloheptyl-, Cxclooctyl-, Cyclononyl- oder Cyclodecylgruppen. Bevorzugt sind Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl- und Cyclohexyl-.

[0011] Der für R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> verwendbare Cycloalkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen kann jeder beliebige Cycloalkenylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl-, Cycloheptenyl-, Cxclooctenyl-, Cyclononenyl- oder Cyclodecenylgruppen. Bevorzugt sind Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl. Beispiele für polyzyklische Alkyl- bzw. Alkenylreste umfassen Norbornan, Adamantan oder Benzvalen.

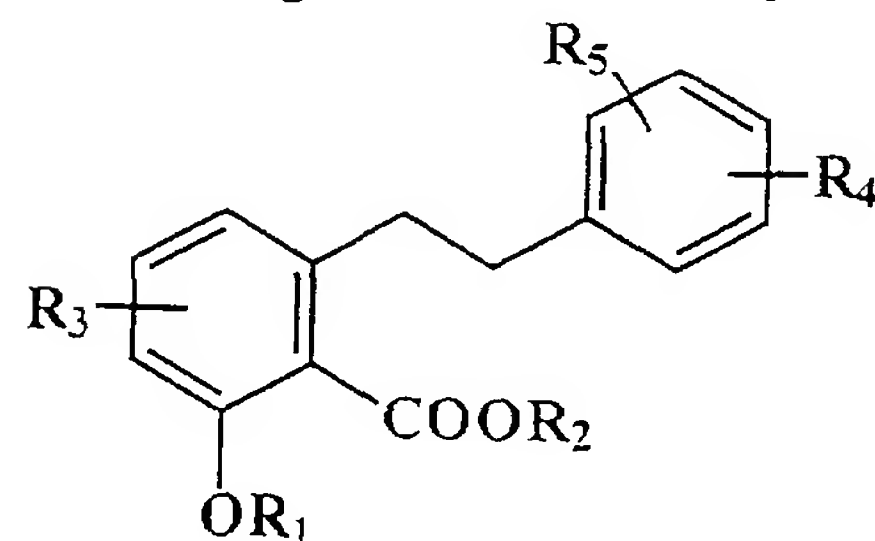
[0012] Vorzugsweise vorhandene Substituenten der verschiedenen vorstehend angegebenen Reste X, R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> sowie des Grundgerüsts als Substituent R<sub>3</sub> können aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden:

- Halogen: Fluor, Chlor, Brom, Iod,
- Amino, Alkylamino, Dimethylamino oder Ethylamino, Dialkylamino, wie Dimethylamino, Diethylamino, Methyl-ethylamino, wobei jeder dieser Dialkylaminoreste gegebenenfalls in Oxidform vorliegt,
- Aminoalkyl, wie Aminomethyl oder Aminoethyl,
- Dialkylaminoalkyl, wie Dimethylaminomethyl oder -ethyl,
- Dialkylaminoalkyloxy, wie Dimethylaminoethyloxy,
- Hydroxyl,
- freie, veresterte Carboxylgruppe, wie Alkoxycarbonyl, beispielsweise Methoxycarbonyl oder Ethoxycarbonyl, oder in ein Salz, beispielsweise durch ein Natrium- oder Kaliumatom überführt,
- Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituiert, beispielsweise durch Fluor, wie Trifluormethyl,
- Oxo, Cyano, Nitro, Formyl,
- Acyl, wie Acetyl, Propionyl, Butyryl, Benzoyl,
- Acyloxy, wie Acetoxy oder ein Rest der Formel: -O-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H, worin n = 1 bis 5,
- Alkoxy, wie Methoxy, Ethoxy, Propyloxy, Isopropyloxy, Butyloxy,
- Alkylthio, wie Methylthio, Ethylthio, Propylthio, Isopropylthio, Butylthio,
- Carbamoyl,
- Alkenyl, wie Vinyl, Propenyl,
- Alkinyl, wie Ethinyl, Propinyl und
- Aryl, wie Phenyl, Furyl, Thienyl.

[0013] Als Beispiele für derartige substituierte Reste können ein durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituierter Alkylrest, wie die Trifluormethyl-, Trifluorbutyl-, Pentafluorpropyl-, Pentafluorbutyl-, Pentafluorpenyl-, Heptafluorbutyl- oder Nonafluorbutylgruppe oder 2-Chlorethyl- genannt werden.

[0014] Verbindungen der obigen Formeln (I) und (II) werden im weiteren mit dem Begriff "Lunularsäurederivate" beschrieben.

[0015] Bevorzugte Verbindungen sind:

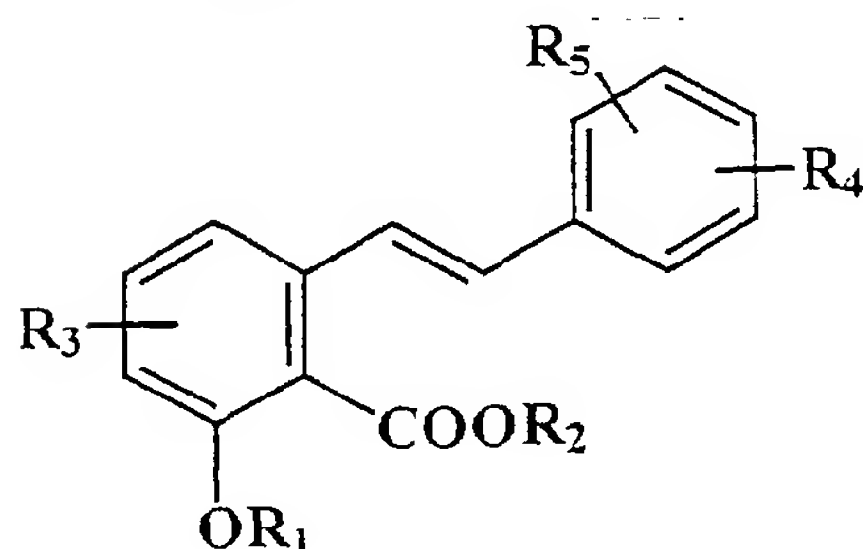


R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>  
R<sub>3</sub> -R<sub>5</sub> = H, OH, OR, Br, Cl, AcO

3,4-

3,5-

2,6



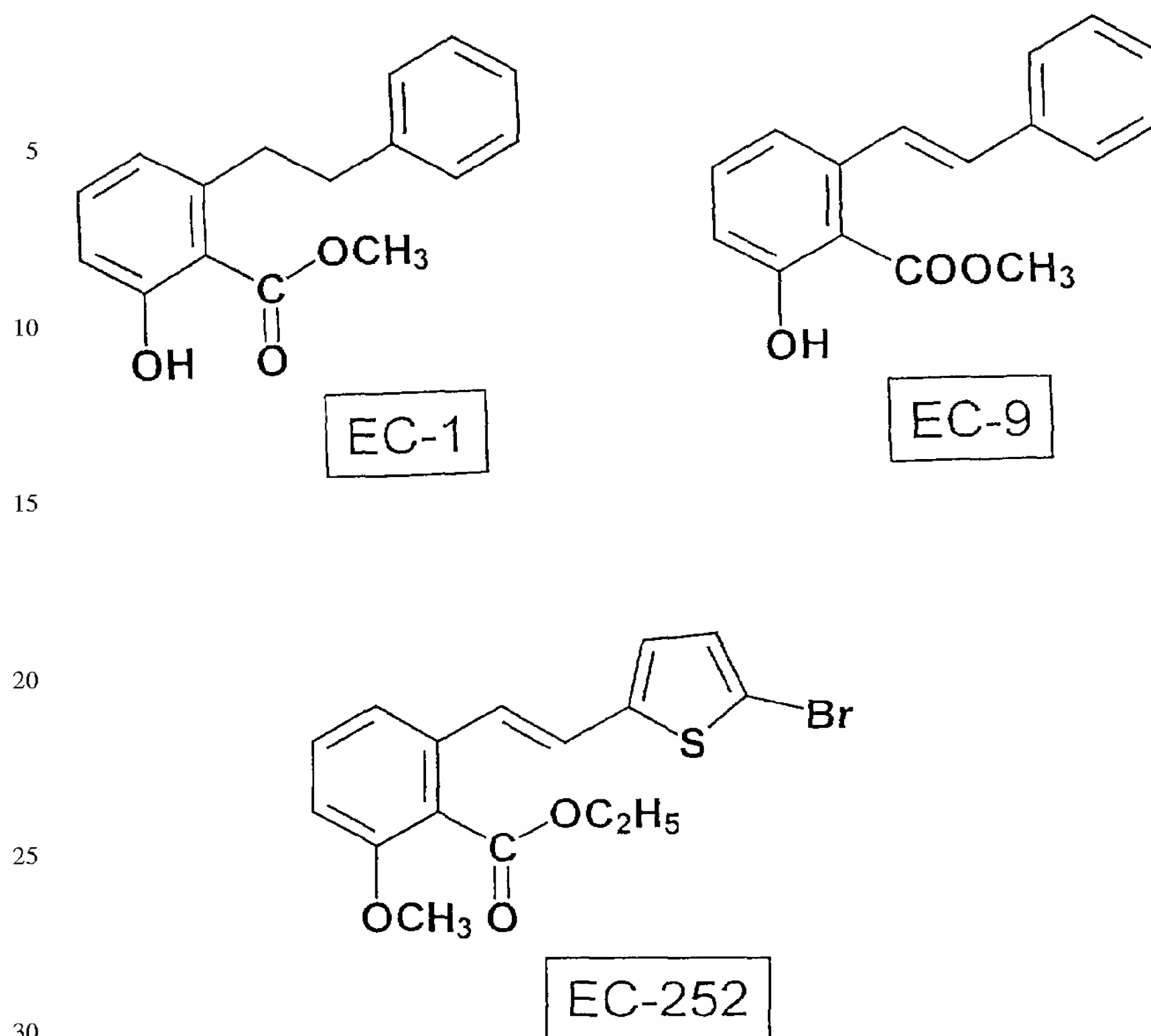
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>  
R<sub>3</sub> -R<sub>5</sub> = H, OH, OR, Br, Cl, AcO

3,4-

3,5-

2,6

[0016] Erfindungsgemäß ganz bevorzugte Verbindungen sind:



**[0017]** Vorzugsweise werden die Verbindungen der obigen Formeln gemäß dem in **Fig. 1** gezeigten Syntheschema hergestellt.

**[0018]** Die vorstehend genannten erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich zur Prävention von Krebserkrankungen aller Art, indem sie einerseits bestimmte Stoffwechselprozesse hemmen, bei denen Stoffe entstehen, die die Krebsentstehung fördern, und andererseits bestimmte Stoffwechselprozesse fördern, die beispielsweise karzinogene Substanzen abfangen. Die Modulation von Enzymen, die bei der metabolischen Aktivierung und Freisetzung von Carcinogenen beteiligt sind, ist einer der am besten untersuchten Mechanismen für chemoprotektive Agentien. Phase 1-Enzyme (Cytochrome P450) aktivieren Xenobiotika durch das Einfügen von funktionellen Gruppen, die diese Verbindungen besser wasserlöslich machen. Obwohl diese Funktionalisierung über Phase 1-Enzyme für die komplette Detoxifizierung von Substanzen notwendig ist, kann die Induktion von Phase 1-Enzymen das Risiko erhöhen, Carcinogene zu produzieren, die mit DNA reagieren können und Carcinogenese initiieren. Phase 2-Enzyme konjugieren die aktivierten Verbindungen an endogene Liganden, wie Glutathion oder Glucuron-, Essig- oder Schwefelsäure, wodurch die Freisetzung der Verbindungen in Form dieser Konjugate vermehrt wird. Allgemein stellt die Inhibierung von Phase 1-Enzymen gleichzeitig mit der Induktion von Phase 2 Enzymen eine logische Strategie bei der Chemoprävention dar, was besonders vorteilhaft in frühen Stadien der Carcinogenese ist. Um Modulatoren des Arzneimittel-Metabolismus zu identifizieren und damit eine Aussage über chemopräventive Agentien zu erhalten, werden beispielsweise die inhibitorischen Effekte auf die Phase 1 Cyp1A Aktivität und auf die Induktion der Phase 2 NAD(P)H:Chinonreduktase (QR) Aktivität bestimmt. Dazu werden beispielsweise  $\beta$ -Naphthoflavon-induzierte Rattenhepatomzellen als Quelle von Cyp1A verwendet. Die zeitabhängige Dealkylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin kann fluorometrisch in 96-Loch-Platten verfolgt werden (Crespi et al., Anal. Biochem. (1997), 248 (1): 188-190). Die Induktion von QR-Aktivität als Modell-Phase 2-Enzym wird beispielsweise colorimetrisch in kultivierten Hepa 1c1c7-Zellen gemessen. Dazu wird die NADPH-abhängige Menadiol-vermittelte Reduktion von MTT (3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blaues Formazan untersucht (Prochaska et al., Anal. Biochem. 1988, 169(2): 328-336).

**[0019]** Die Verbindungen der obigen Formeln sind gut verträglich und können im Rahmen eines Arzneimittels zur Prävention von Krebserkrankungen verabreicht werden.

**[0020]** Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann auf verschiedenen Wegen verabreicht werden, z. B. oral, parenteral, kutan, subkutan, intravenös, intramuskulär oder rektal. Bevorzugt ist die nicht-invasive, d. h. orale, subkutane oder rektale, Verabreichung. Das Arzneimittel wird einem Patienten über einen vom Arzt zu bestimmenden Zeitraum oder wird stetig über lange Zeiträume verabreicht. Das Arzneimittel kann sowohl Menschen als auch Säugern verabreicht werden. Das Arzneimittel bietet sich auch an als Überstützungsmedikation vor, während oder nach einer Tumorthherapie (Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie) an.

**[0021]** Die Dosierung der erfindungsgemäßen Verbindung wird vom Arzt anhand der patientenspezifischen Parameter wie z. B. Alter, Gewicht, Geschlecht, Schwere der Erkrankung, etc. bestimmt.

**[0022]** Entsprechend der Art der Verabreichung wird das Arzneimittel in geeigneter Weise formuliert, z. B. in Form von einfachen oder dragierten Tabletten, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Pulver zur Rekonstitution vor Gebrauch, Granulaten, Suppositorien, Ovula, Injektionspräparaten, Infusionslösungen, Pomaden, Cremes, Gels, Mikrosphären, Implantaten, die nach üblichen galenischen Verfahren hergestellt werden.



[0023] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können gegebenenfalls zusammen mit weiteren Wirkstoffen und mit in pharmazeutischen Zusammensetzungen üblichen Exzipientien formuliert werden, z. B. je nach herzustellendem Präparat Talk, Gummi arabicum, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Kakaobutter, wäßrige und nichtwäßrige Träger, Fettkörper mit tierischem oder pflanzlichem Ursprung, Paraffinderivate, Glykole (insbesondere Polyethylenglykol), verschiedene Weichmacher, Dispergiermittel oder Emulgatoren, Konservierungsstoffe. 5

[0024] Zur Herstellung flüssiger Präparate können Additive wie Natriumchloridlösung, Ethanol, Sorbit, Glycerin, Olivenöl, Mandelöl, Propylenglycol oder Ethylenglycol verwendet werden.

[0025] Es können auch Infusions- oder Injektionslösungen hergestellt werden. Diese sind bevorzugt wäßrige Lösungen oder Suspensionen, wobei es möglich ist, diese vor Gebrauch herzustellen, beispielsweise aus lyophilisierten Präparaten, die den Wirkstoff alleine oder zusammen mit einem Träger, wie Mannit, Lactose, Glucose, Albumin und dergleichen, enthalten. Die gebrauchsfertigen Lösungen werden sterilisiert und gegebenenfalls mit Hilfsmitteln vermischt, beispielsweise mit Konservierungsstoffen, Stabilisatoren, Emulgatoren, Lösungsvermittlern, Puffern und/oder Salzen zur Regulierung des osmotischen Drucks. Die Sterilisierung kann durch Sterilfiltration durch Filter mit einer kleinen Porengröße erzielt werden, wonach die Zusammensetzung gegebenenfalls lyophilisiert werden kann. Geringe Mengen an Antibiotika können auch zugesetzt werden, um die Beibehaltung der Sterilität zu unterstützen. 10 15

[0026] Vorteilhaft ist die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Arzneimittels in einer Dosis-Einheits-Form zur Verabreichung an einen Säuger.

[0027] Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel bzw. pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Menge des aktiven Inhaltsstoffs (erfindungsgemäße Verbindung der obigen Formeln) zusammen mit organischen oder anorganischen inerten festen oder flüssigen pharmazeutisch verträglichen Trägern bzw. Verdünnungsmitteln, die für die beabsichtigte Verabreichung geeignet sind, und die mit den aktiven Inhaltsstoffen nicht nachteilig wechselwirken, enthalten. 20

[0028] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Produktion einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die erfindungsgemäße Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger vermischt wird. 25

[0029] Unter den erfindungsgemäßen Medikamenten können insbesondere die im experimentellen Teil beschriebenen Verbindungen und ganz besonders die Verbindungen, bei denen in der obigen Formel (I) oder (II) R1 und/oder R2, die gleich oder verschieden sein können, eine Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylgruppe ist, genannt werden.

[0030] Die erfindungsgemäßen Arzneimittel bzw. pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen als Wirkstoff mindestens einen wie vorstehend definierten Wirkstoff. Gegebenenfalls können noch weitere pharmazeutische Wirkstoffe in die Zusammensetzung aufgenommen werden, wie z. B. 30

- Antioxidantien [z. B. red. Gluthathion, N-Acetylcystein, natürliche Polyphenole wie Grüntee-(Epigallocatechin-gallat und andere Catechine) oder Rotweinbestandteile (Resveratrol), Anthocyanidine, Flavonoide, Procyanidine],
- Vitamine [z. B. hochdosiertes Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A, Vitamin D], 35
- Mineralstoffe [z. B. Magnesium, Zink, Calcium],
- Spurenelemente [z. B. Selen],
- Entzündungshemmer [z. B. Cyclooxygenase 1 oder 2 Hemmer (Nichtsteroidale Entzündungshemmer NSAIDs, wie ASS etc.), Lipoxigenasehemmer oder Hemmstoffe der induzierbaren Stickstoffoxidsynthese],
- Hormonmodulatoren [z. B. Antiöstrogene (z. B. Tamoxifen, Genistein) oder Aromatasehemmer], 40
- Angiogenesehemmer [z. B. Genistein],
- Modulatoren der Signalübertragung [z. B. Proteinkinasehemmer (z. B. Curcumin oder Ras-Farnesylierungshemmer, wie Perillylalkohol oder Limonen)],
- Proliferationshemmer,
- Ornithin-Decarboxylase-Hemmer [z. B. DFMO] 45
- Apoptose-Induktoren
- Ballaststoffe (auch als Vorstufen von kurzkettigen Fettsäuren)
- Induktoren von Zellproliferationsprozessen [z. B. Natriumbutyrat]

[0031] Die Erfindung wird weiter anhand der Figur erläutert: 50

[0032] Fig. 1: Syntheschema

[0033] Fig. 2: Dosis-abhängige Inhibierung der präneoplastischen Läsionsbildung in einem MMOC-Modell durch EC-252

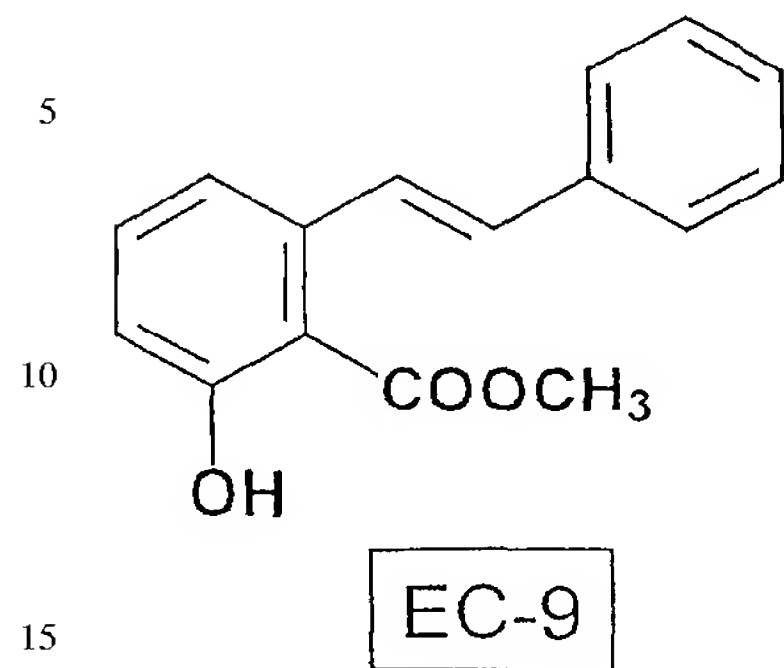
[0034] Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele näher erläutert. 55

#### Beispiel 1

##### Verfahren zur Herstellung von E-6-(~~o~~-Styryl)salicylsäuremethylester (EC-9)

[0035] Zu einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol (bereitet durch Auflösen von 9,20 g (400 mMol) Natrium in 300 ml wasserfreiem Methanol) gibt man 56,3 g (100 mMol) (3-Acetoxy-2-methoxycarbonyl)benzyl-triphenyl-phosphoniumbromid (Eicher et al., Synthesis 1988, S. 525) und rührt 30 Min. bei +20°C. Danach fügt man 10,6 g (100 mMol) Benzaldehyd (käufliches Produkt frisch destilliert) zu und erhitzt das Reaktionsgemisch 4 Std. unter Rückfluß. Danach kühlt man auf Raumtemperatur ab, neutralisiert durch Zugabe von Eisessig und entfernt das Solvens im Vakuum. Man nimmt den Rückstand in 300 ml Chloroform auf, wäscht zweimal mit je 100 ml Wasser, trocknet die organische Phase über MgSO<sub>4</sub>, filtriert sie über 200 g Kieselgel (Nachelution mit wenig CHCl<sub>3</sub>) und entfernt das Solvens im Vakuum. Man erhält ein farbloses Öl, das in ca. 150 ml Petrolether (40–60°C) aufgenommen und bei –30°C (15 h) zur Kristallisation gebracht wird. Man erhält 23,6 g (93%) farblose Nadeln, E/Z-Gemisch, Smp. 51–52°C. Aus dem E/Z-Ge- 60 65

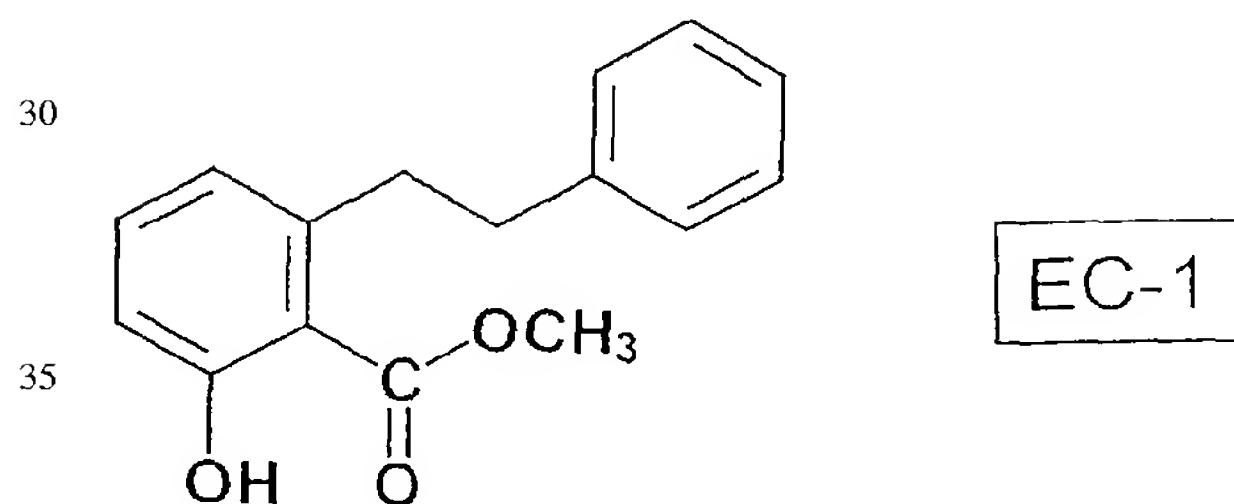
misch kann durch Erhitzen in Toluol (30 Std. unter Rückfluß) in Gegenwart von Iod (einige mg) das reine E-konfigurierte Produkt quantitativ erhalten werden (Smp.: 56–57°C).



### Beispiel 2

#### Verfahren zur Herstellung von 6-(2-Phenylethyl)salicylsäuremethylester (EC-1)

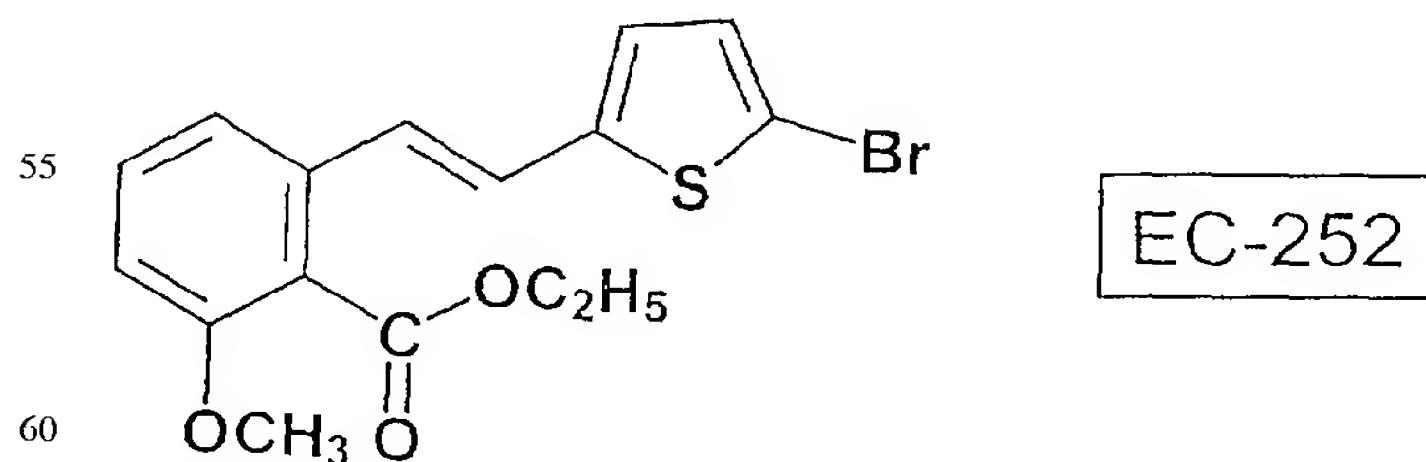
[0036] 22,0 g (86,3 mMol) des Produkts aus Beispiel 1 werden in 300 ml Essigester gelöst. Man fügt 2,0 g Palladium auf Aktivkohle (5%) als Katalysator zu und hydriert in einer konventionellen Hydrierapparatur (Fa. Parr) bei 5 bar Wasserstoff-Überdruck. Nach ca. 4 Std. ist die Wasserstoff-Aufnahme beendet. Man filtriert vom Katalysator ab, entfernt das Solvens im Vakuum, nimmt den Rückstand in Chloroform auf und filtriert die  $\text{CHCl}_3$ -Lösung über 300 g Kieselgel (Nachelution mit wenig  $\text{CHCl}_3$ ). Das Filtrat wird im Vakuum vom Solvens befreit und der Rückstand aus Petrolether (40–60°C) umkristallisiert. Man erhält 19,9 g (90%) des Produkts, farblose Prismen, Smp. 55–56°C.



### Beispiel 3

#### Verfahren zur Herstellung von E-1-(5-Bromthienyl)-2-[(2-ethoxycarbonyl-3-methoxy)phenyl]ethen (EC-252)

[0037] Zu einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol (bereitet durch Auflösen von 0,30 g (13,0 mMol) Natrium in 50 ml wasserfreiem Methanol) gibt man 5,63 g (10,0 mMol) (2-Ethoxycarbonyl-3-methoxy)benzyl-triphenylphosphoniumbromid (Eicher et al., Synthesis 1988, S. 525) und rührt 30 Min. bei +20°C. Danach fügt man 1,91 g (10,0 mMol) 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd (Fa. Acros Organics, Geel, Belgien) zu und rührt das Reaktionsgemisch 24 Std. bei +20°C. Das auskristallisierte Produkt wird abgesaugt und in 50 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird über 50 g Kieselgel filtriert (Nachelution mit wenig  $\text{CHCl}_3$ ). Das Solvens wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand [2,90 g (79%) E/Z-Gemisch] zweimal aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 1,84 g (50%) des Produkts, gelbliche Nadeln, Smp. 93–94°C.



### Beispiel 4

#### Bestimmung der chemopräventiven Aktivität ausgewählter Lunularsäurederivate

[0038] Hepa1c17-Zellen (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) sät man in einer 96-Lochplatte in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml (200 µl pro Loch) in  $\alpha$ -MEM enthaltend 100 Einheiten/ml Penicillin G-

Na, 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat und 250 ng/ml Amphotericin B (Gibco BRL, Grand Island, NY) ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aus. Nach einer Präinkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium erneuert, die Testverbindungen (Lunularin, Lunularsäure [beide Kontrolle], EC-1, EC-9 und EC-252) gelöst in 10% DMSO (10 µl, Endkonzentration 0,5%) zugegeben und die Platten für weitere 48 Stunden inkubiert. Die QR-Aktivität wurde durch Messen der NADPH-abhängigen Menadiol-vermittelten Reduktion von. MTT (3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu blauem Formazan gemessen (Prochaska et al., Anal. Biochem. 1988, 169(2): 328–336). Die Proteine wurden durch Kristallviolett-Färbung eines identischen Satzes von Platten bestimmt. Die Induktion der QR-Aktivität wurde aus dem Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten der mit den Verbindungen behandelten Zellen zu einer Lösungsmittelkontrolle berechnet. Die CD-Werte (benötigte Konzentration in µM, um die spezifische Enzymaktivität zu verdoppeln) wurden erzeugt. Die CD-Werte wurden mit den IC<sub>50</sub>-Werten (halbmaximale inhibitorische Konzentration der Zell-Lebensfähigkeit in µM) ins Verhältnis gesetzt, um den chemopräventiven Index CI zu erhalten. Zusätzliche Tests wurden in einer von Hepa 1c1c7-Zellen abgeleiteten Mutanten-Zelllinie (BP<sup>r</sup>c1) unternommen, welche unfähig ist, den Ah Rezeptor-Ligandenkomplex in den Kern zu translocieren.

Tabelle 1 15

Induktion von NAD(P)H : Chinonoxidoreduktase (QR) durch ausgewählte Bibenzyle (alle Daten in µM)

	Hepa1c1c7			BP <sup>r</sup> c1
	CD/CQ	IC <sub>50</sub>	CI	CD
A	51,4/n.d	> 93,5	> 1,8	n.I
B	20,4/n.d.	> 50	2,5	n.I
EC-1	0,22/6,8	31,3	171	n.I
EC-252	0,06/0,24	7,8	129	n.I
EC-9	0,03/0,16	7,2	223	n.I

- CD/CQ = Konzentration, um die spezifische Aktivität von QR zu verdoppeln/zu vervierfachen 40
- IC<sub>50</sub> = halbmaximale inhibitorische Konzentration
- CI = Chemopräventiver Index ; Verhältnis von IC<sub>50</sub> und CD
- n.d. = nicht bestimmt 45
- n.I. = keine Induktion
- A = Lunularin (Kontrolle)
- B = Lunularsäure (Kontrolle) 50

[0039] Nachfolgend wurde die Dosis-abhängige Induktion von Cyp1A-Aktivität in kultivierten Hepa1c1c7 bestimmt. Die Hepa1c1c7-Zellen wurden analog wie oben beschrieben für 24 Stunden mit 0,5 µM β-Naphthoflavon, einem klassischen bifunktionellen Induktor von Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen, behandelt. Zum Vergleich des induzierenden Potentials wurden die für die 10-fache Anhebung der Cyp1A-Aktivität erforderlichen Konzentrationen ermittelt. Da die Induktion von Cyp1A zu der Aktivierung von Procarcinogenen führen kann, wurde weiter das Potential, um Cyp1A-Aktivität zu inhibieren, getestet. Diese Untersuchungen wurden an Lysaten von β-Naphthoflavon-induzierten H4IIE Rattenhepatoma-Zellen und CEC als Substrat gemacht. H4IIE-Zellen (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) werden dazu in 10 cm Zellkulturplatten mit einer Dichte von 1 × 10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml MEME-Medium mit den gleichen Zusätzen, wie vorstehend für das α-MEM-Medium angegeben, ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Danach wird das Medium erneuert und die Zellen für 38 Std. mit 10 µM β-Naphthoflavon zur Induktion von Cyp1A induziert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, durch Abschaben in 1 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Puffer 1) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Aktivitätsbestimmung wird das Zellhomogenat bei Raumtemperatur aufgetaut, zur Lyse durch eine Kanüle Nr. 20 gedrückt und mit Puffer 1 auf 10 ml verdünnt. 90 µl dieser Lösung (ca. 5–25 µg Protein) werden in 96-Lochplatten zu einer Mischung aus 10 µl der Testsubstanz in DMSO und 100 µl Reaktionsgemisch (2-fach konzentriert) enthaltend 2,6 mM NADP, 6,6 mM Glucose-6-Phosphat, 10 µM 3-Cyano-7-Ethoxycumarin (CEC) und 0,5 Einheiten Glucose-6-phosphatdehydrogenase gegeben. Der Ansatz wird kurz gemischt. Die Kinetik der zeitabhängigen Dealkylierung von CEC wird 45 Min. lang bei 37°C im Mikro-

titerplattenfluorimeter mit einer Anregungswellenlänge von 409 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm aufgenommen (vgl. Crespi et al., Anal. Biochem. (1997), 248 (1), S. 188–190).

Tabelle 2

5

Modulation von Cyp1A-Aktivität durch ausgewählte Bibenzyle (alle Daten in  $\mu\text{M}$ )

	<u>Cyp1A-Induktion</u>	<u>Cyp1A-Inhibierung</u>
	$C_{10\text{-fach}}$	IC50
10		
15	A	> 93,5
	B	8,0
	EC-1	2,1
20	EC-252	0,225
	EC-9	< 0,13
25	$C_{10\text{-fach}}$ : Konzentration resultierend in einer 10-fachen Induktion der Cyp1A-Aktivität	
	IC50: Halbmaximale inhibitorische Konzentration	
30	A :	Lunularin (Kontrolle)
	B :	Lunularsäure (Kontrolle)

Beispiel 5

35

Nachweis der chemopräventiven Aktivität erfindungsgemäßer Verbindungen im Maus-Brustdrüsenmodell

[0040] Ein Nachteil von in-vitro Untersuchungen ist, daß die glatte Übertragbarkeit auf die in-vivo Situation oft nicht gegeben ist. Es wurde jedoch jetzt ein Organkulturmodell entwickelt, das als Klammer zwischen Kurzzeit-in vitro-Ver-

40

suchen und Langzeit-in vivo-Carcinogenesemodellen dienen kann. Dies ist das Maus-Brustdrüsenmodell (mouse mammary glands, MMOC; Mehta et al., Carcinogenesis 1995, 16(2), S. 399–404). Dieses System kombiniert die Vorteile eines in-vitro-Modells (Einfachheit, Handhabbarkeit, Dauer) mit den komplexen zellulären, metabolischen und Entwicklungsbedingungen in einem Organismus.

[0041] 3 bis 4 Wochen alte jungfräuliche weibliche BALB/c Mäuse wurden durch tägliche subkutane Injektionen mit 1  $\mu\text{g}$  Östradiol 17 $\beta$  und 1 mg Progesteron für 9 Tage vorbereitet. Am Tag 10 werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das thorikale Brustdrüsenpaar entnommen, das auf ein Seidengewebe gelegt wird. Diese Gewebepräparationen wurden 10 Tage in serumfreiem Waymouth MB752/I-Medium (5 Drüsen/5 ml Medium/Platte) inkubiert. Das Medium ist ergänzt mit 2 mM Glutamin, Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, jeweils 100 Einheiten/ml Lösung) und wachstumsfördernden Hormonen, 5  $\mu\text{g}$  Insulin, 5  $\mu\text{g}$  Prolaktin, 1  $\mu\text{g}$  Aldosteron und 1  $\mu\text{g}$  Hydrocortison pro ml Medium. Das Carcinogen DMBA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wird dem Medium für 24 Stunden zwischen den Tagen 3 und 4 zugesetzt. Dieses Zeitintervall stellt den Zeitraum der DNA-Synthese dar. Kontrollplatten wurden mit DMSO (DMBA-Lösungsmittel) behandelt. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Drüsen für weitere 14 in einem Medium gehalten, das nur Insulin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthielt. Während der gesamten Kulturdauer wurden die Drüsen bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre gehalten.

[0042] Die erfindungsgemäße Verbindung EC-252 (Testagenz) wurde in verschiedenen Konzentration zu dem Medium für die Tage 0–10 gegeben (10–15 Drüsen pro Konzentration). Carcinogenbehandelte Drüsen ohne Testagenz dienten als Positivkontrolle. Am Ende des Experiments nach 24 Tagen wurden die Drüsen in 10% Formalin fixiert, mit Alauncarmin gefärbt und morphologisch das Vorhandensein von Drüsenläsionen untersucht. Das Auftreten (Inzidenz) von gebildeten Läsionen (Prozentsatz der Drüsen mit Läsionen bezüglich der Gesamtanzahl der Drüsen pro Gruppe) in der mit EC-252 behandelten Gruppe wird mit den Läsionen in der nur mit DMBA-behandelten Gruppe (unbehandelte Gruppe = DMBA-Kontrolle) verglichen und daraus der Prozentsatz der Inhibierung berechnet. Das Ergebnis ist in **Fig. 2** gezeigt.

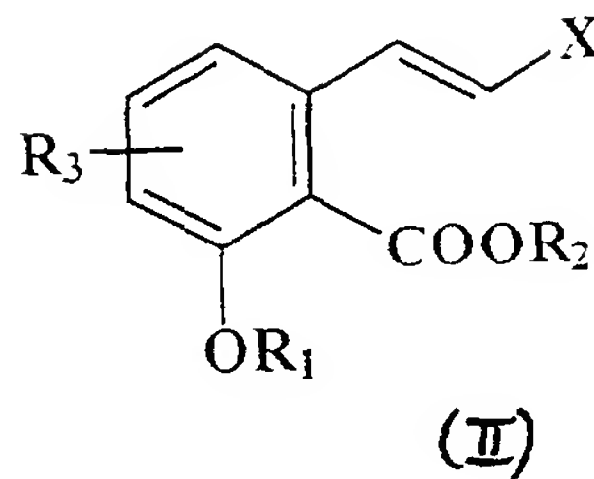
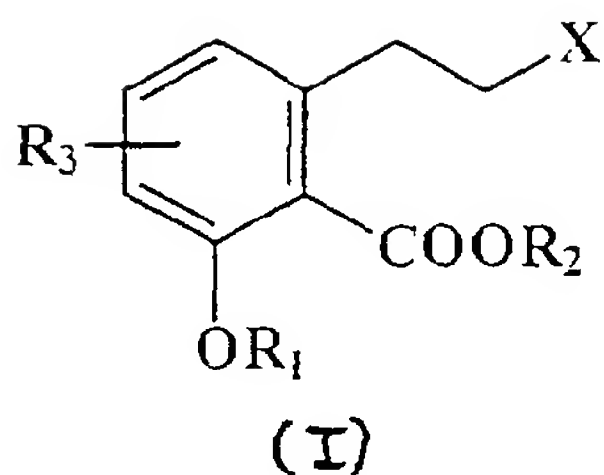
60

## Patentansprüche

65

1. Lunularsäurederivat **gekennzeichnet durch** Formel (I) oder (II):





worin X einen mono- oder polycyclischen (Hetero)Arylrest bedeutet,

R1 und/oder R2 jeweils unabhängig voneinander einen geraden oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen geraden oder verzweigten Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polycyclischen Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polycyclischen Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen, oder einen mono- oder polycyclischen aromatischen Rest mit 6 bis 30 Kohlenstoffatomen bedeuten,

wobei die Reste X, R1, R2 gegebenenfalls durch einen oder mehrere Substituenten substituiert sein können, wobei diese Substituenten und/oder R3 ausgewählt sind

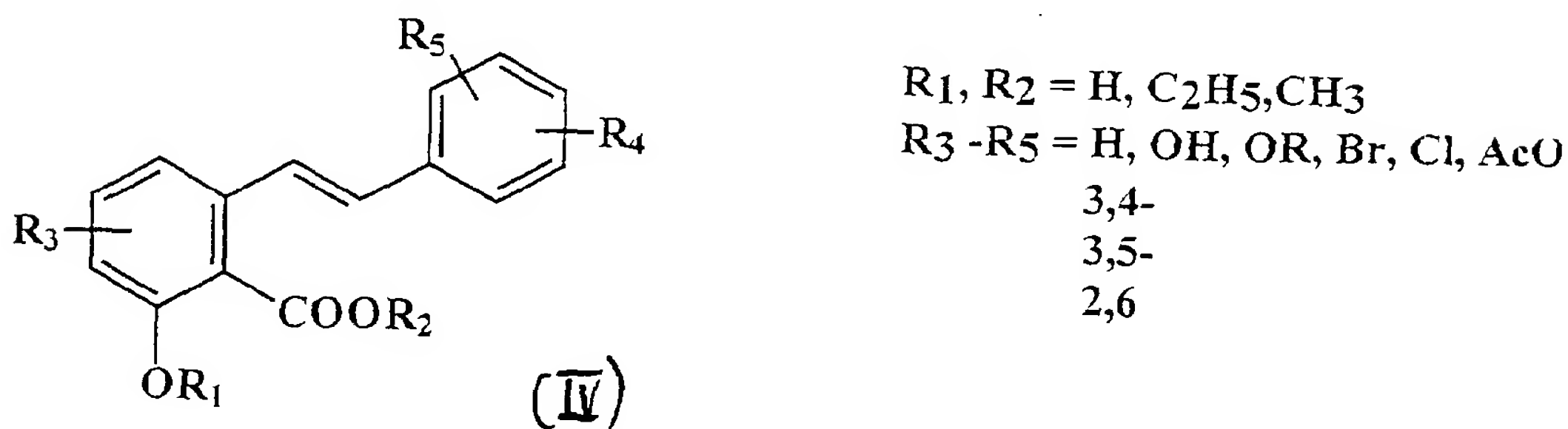
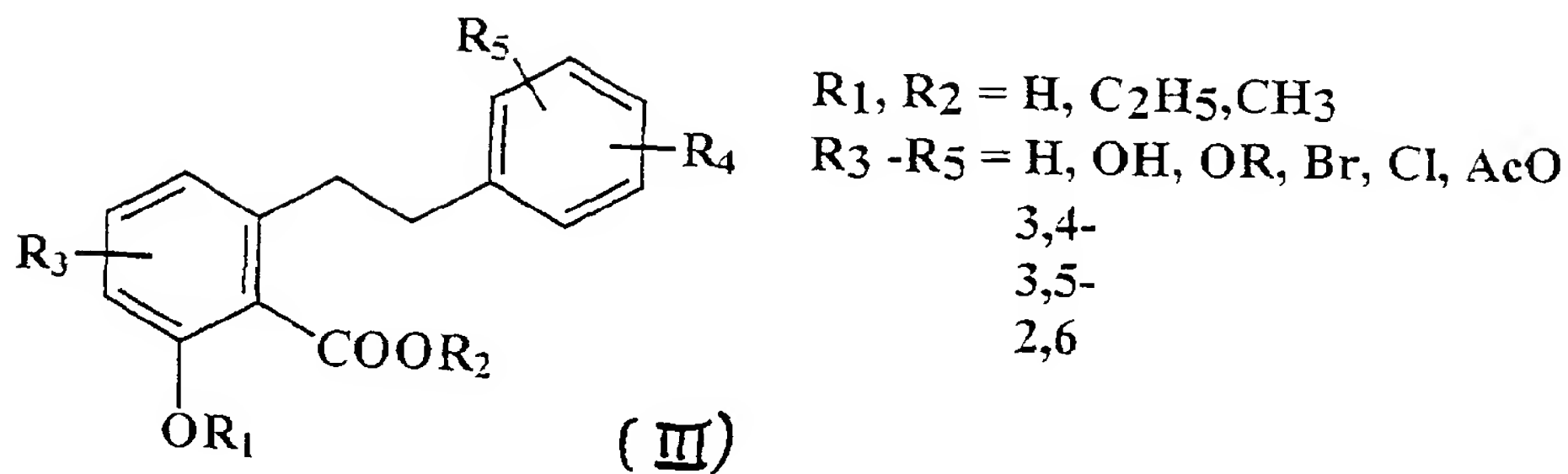
aus:

- Halogen: Fluor, Chlor, Brom, Iod.
- Amino, Alkylamino, Dimethylamino oder Ethylamino, Dialkylamino, wie Dimethylamino, Diethylamino, Methylethylamino, wobei jeder dieser Dialkylaminoreste gegebenenfalls in Oxidform vorliegt,
- Aminoalkyl, wie Aminomethyl oder Aminoethyl,
- Dialkylaminoalkyl, wie Dimethylaminomethyl oder -ethyl,
- Dialkylaminoalkyloxy, wie Dimethylaminoethyloxy,
- Hydroxyl,
- freie, veresterte Carboxylgruppe, wie Alkoxycarbonyl, beispielsweise Methoxycarbonyl oder Ethoxycarbonyl, oder in ein Salz, beispielsweise durch ein Natrium- oder Kaliumatom überführt,
- Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituiert, beispielsweise durch Fluor, wie Trifluormethyl,
- Oxo, Cyano, Nitro, Formyl,
- Acyl, wie Acetyl, Propionyl, Butyryl, Benzoyl,
- Acyloxy, wie Acetoxy oder ein Rest der Formel:

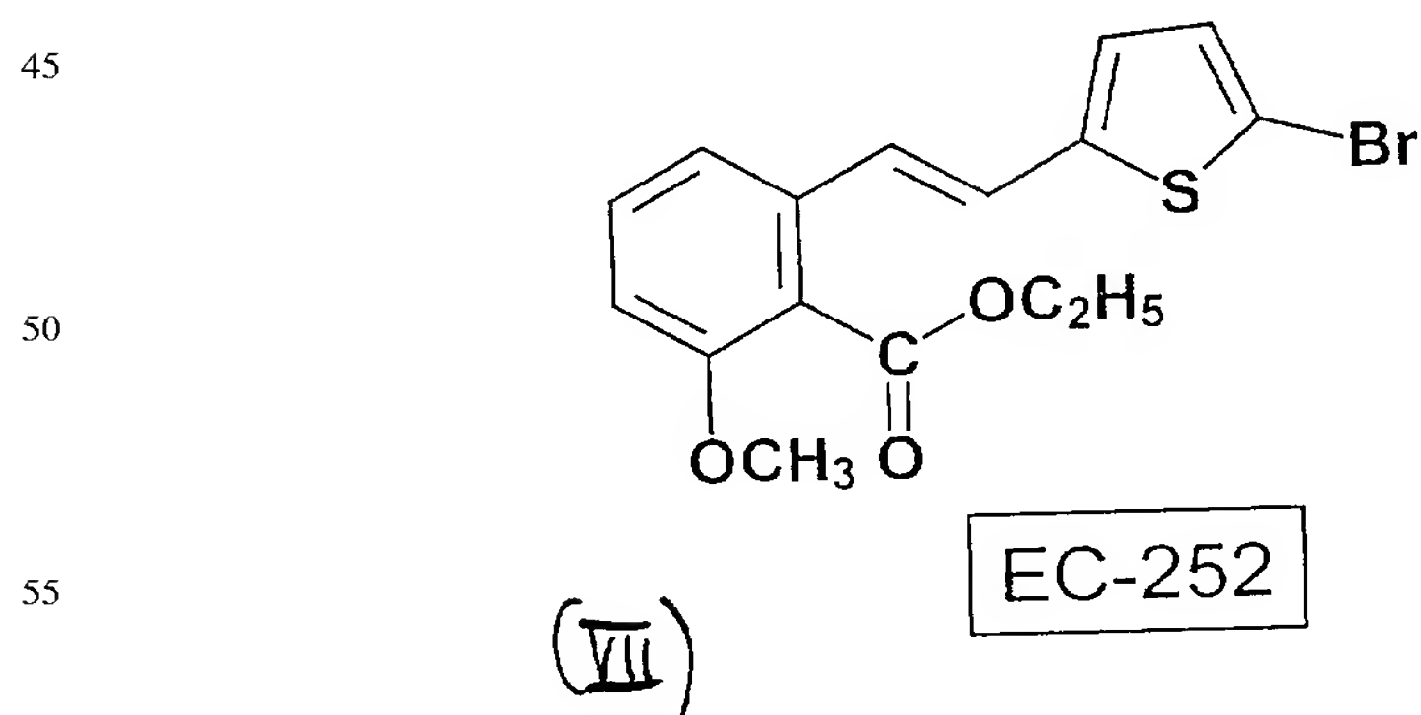
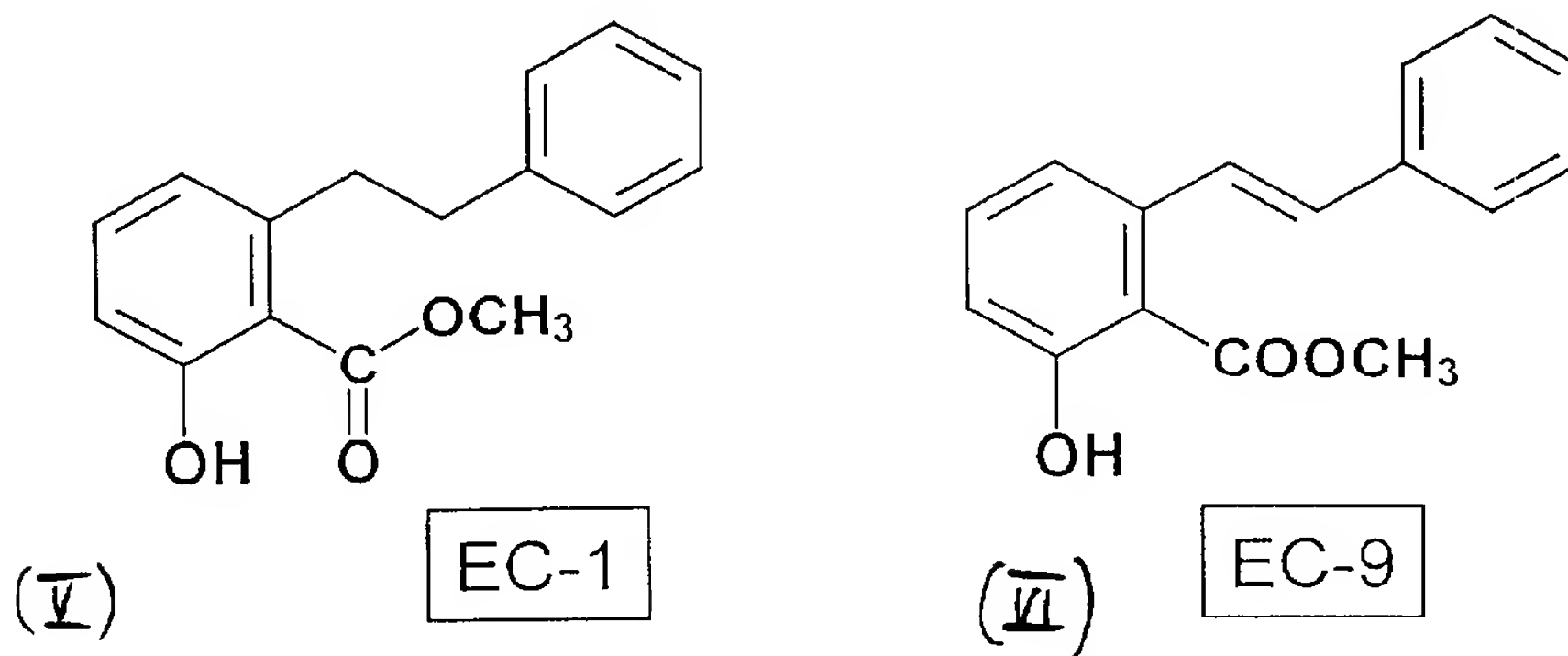
$O-CO-(CH_2)_nCO_2H$ , worin  $n = 1$  bis 5,

- Alkoxy, wie Methoxy, Ethoxy, Propyloxy, Isopropyloxy, Butyloxy,
- Alkylthio, wie Methylthio, Ethylthio, Propylthio, Isopropylthio, Butylthio,
- Carbamoyl,
- Alkenyl, wie Vinyl, Propenyl,
- Alkinyl, wie Ethinyl, Propinyl und
- Aryl, wie Phenyl, Furyl, Thienyl.

2. Lunularsäurederivat nach Anspruch 1 gekennzeichnet durch Formel (III) oder (IV):



25 3. Lunularsäurederivat nach Anspruch 1 oder 2 mit der Formel (V), (VI) oder (VII):



60 4. Arzneimittel gekennzeichnet durch einen Gehalt an – mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) oder (VII).

5. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1–4, umfassend zusätzlich Vitamine, Mineralstoffe, Antioxidantien, Spurenelemente, Entzündungshemmer, Hormonmodulatoren, Angiogenesehemmer, Modulatoren der Signalübertragung, Proliferationshemmer, Ornithindecaboxylasehemmer, Apoptose-Induktoren, Ballaststoffe und/oder Induktoren von Zellproliferationsprozessen.

6. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1–5 bereitgestellt in einer Dosis-Einheits-Form zur Verabreichung an einen Säuger.

7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1–6 umfassend weiter einen pharmazeutisch verträglichen inerten Träger oder ein Verdünnungsmittel.

8. Verwendung eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 1–8 zur Prävention einer Krebserkrankung.  
9. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1–7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung gemäß Formel (I) oder (II) mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel vermischt wird.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -



# Syntheschema

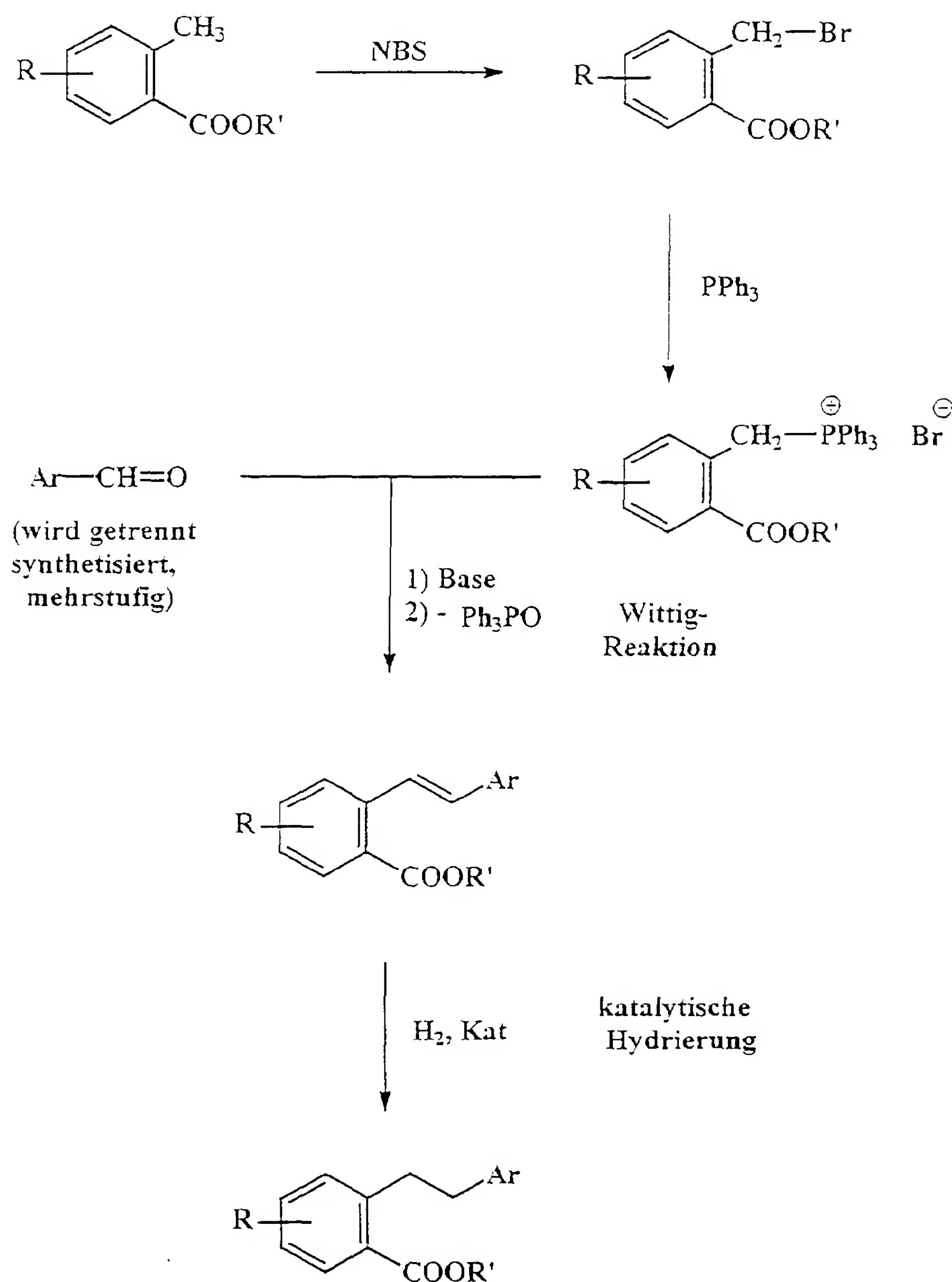


Fig. 1

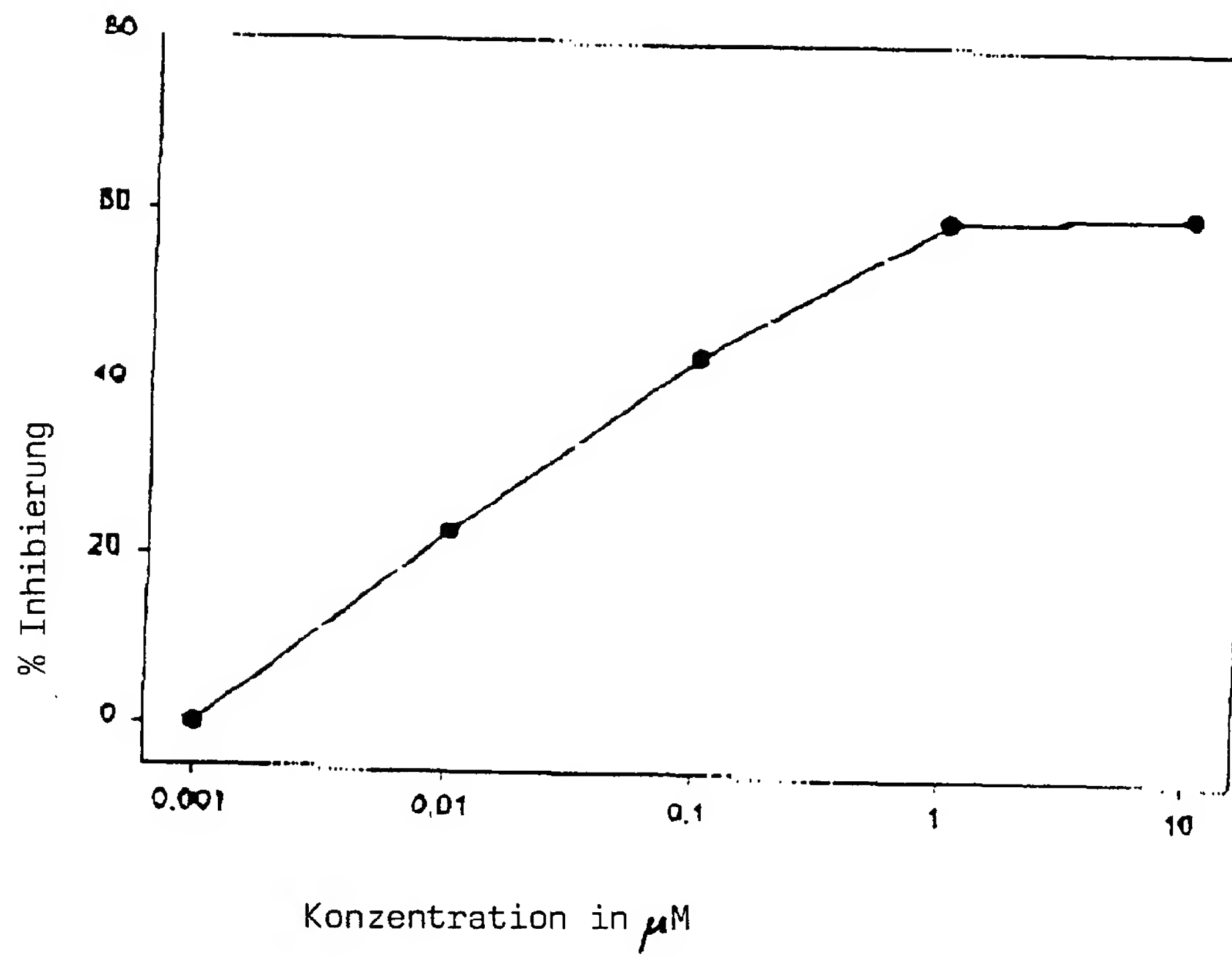


Fig. 2